松叶猪毛菜瞬时转化体系的建立及初步验证

夏春兰[1,2]， 李亚楠[3]， 闻志彬[1]

（1. 中国科学院新疆生态与地理研究所，中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点试验室，新疆 乌鲁木齐 830011；2. 中国科学院大学，北京 100049 ；3.石河子大学生命科学学院，新疆 石河子 832003）

摘 要： 松叶猪毛菜（*Salsola laricifolia*）是典型的荒漠C_3-C_4中间型植物，隶属于藜科（Chenopodiaceae）猪毛菜属，是研究C_4途径进化以及光呼吸减少机制的最佳物种。以松叶猪毛菜无菌苗为试验材料，通过农杆菌介导的瞬时转化方法，分别对质粒载体、苗龄、农杆菌侵染浓度、侵染时间和乙酰丁香酮浓度进行研究，探究各因素对松叶猪毛菜植株瞬时遗传转化效率的影响，以确立最佳的瞬时转化体系；并在上述体系的基础上，过表达松叶猪毛菜叶绿体型NADP-苹果酸酶基因（*SaNADP-ME*1），通过GUS组织化学染色和荧光定量PCR验证瞬时转化效果。结果表明：（1）采用pCAMBIA1301构建表达载体，以30 d苗龄植株作为转化受体，在侵染液中添加200 μmol·L^{-1}乙酰丁香酮，农杆菌菌液OD_{600}为0.8，侵染6 h条件下，瞬时转化效率最佳（92%）；（2）构建过表达载体并瞬时转化松叶猪毛菜植株，通过染色检测到GUS活性，并且荧光定量PCR检测到*SaNADP-ME*1的表达量相比对照组显著增高，该基因成功瞬时过表达转化至植株中。综上所述，本试验在松叶猪毛菜植株中建立了一种快速基因功能验证方法，为以后研究松叶猪毛菜功能基因奠定了基础。

关键词： 松叶猪毛菜（*Salsola laricifolia*）；瞬时转化；农杆菌侵染法；*SaNADP-ME*1

被子植物在由C_3途径向C_4途径的渐进进化过程中，逐渐形成了原“花环”结构、C_3-C_4中间型、C_4-like型和C_4型等光合结构，从而进化出不同的光合阶段[1]。其中，C_3-C_4中间型是被子植物从C_3向C_4途径进化的重要阶段。具有C_3-C_4中间型光合结构的植物被称为“C_3-C_4中间型植物”，其光合结构和生理特征介于C_3和C_4植物之间[2-6]。藜科猪毛菜属的松叶猪毛菜就是典型的C_3-C_4中间型植物[7-10]，因此，研究该植物有助于了解C_4植物的光合进化过程及生态适应策略。

目前，对C_3-C_4中间型植物的研究集中在形态解剖及生理生化等方面[11-13]，有关此类特殊植物基因功能的研究鲜见[14-15]。为了原位验证松叶猪毛菜基因的功能和后续对其他抗逆基因的研究，建立松叶猪毛菜的瞬时遗传转化体系很有必要。近年来，农杆菌介导的瞬时转化基因不需要昂贵的仪器设备和复杂的试验操作过程，发展成为一种快速、有效、简单的基因转化方法[16-19]。可被应用于多项领域，包括基因功能分析、启动子分析、蛋白质亚细胞定位及互作等方面[20]。目前，已经在多种植物组织中建立了农杆菌介导的瞬时表达系统，如本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）和喜树（*Camptotheca acuminata*）利用叶片转化[21-22]，蝴蝶兰（*Phalaenopsis aphrodite*）利用花瓣转化[23]。有的植物多个组织都可以进行瞬时遗传转化[24]。由于这些方法只在植物的部分组织中进行瞬时转化，所以在后续的研究中无法验证瞬时转化后目的基因对于整个植株的影响。由于松叶猪毛菜叶片呈半圆柱状且肥厚[7-8]，加深了转化的难度。在2012年，Zheng等[25]建立了一种基于农杆菌介导的将完整植株长时间浸泡于农杆菌中从而对整个植株进行侵染的瞬时转化方法。邹全程等[26]将此转化方法运用于刚毛柽柳，通过瞬时过表达*ThCBL4*来提高其耐盐能力。

鉴于本研究材料叶片的特殊性及后续对瞬时

收稿日期： 2019-12-05； **修订日期：** 2020-01-08
基金项目： 国家自然科学基金（31670339，31970354）；中国科学院战略生物资源服务网络计划生物标本馆经典分类学青年人才项目（ZSBR-007）资助
作者简介： 夏春兰（1996-），女，硕士生，专业为生物工程. E-mail: 1416167406@qq.com
通信作者： 闻志彬. E-mail: zhibinwen@ms.xjb.ac.cn

转化植株的基因功能的验证,本试验以不同苗龄的松叶猪毛菜植株为转化材料,采用农杆菌介导法,拟建立一种适用于松叶猪毛菜的高效快速的瞬时遗传转化体系。NADP-苹果酸酶(NADP-ME)不仅参与植物的光合作用,提高C_4植物的光合效率,还参与植物的逆境防御及相关代谢活动[27]。课题组前期的研究表明(未发表研究),松叶猪毛菜在干旱胁迫下通过增强C_4途径来抵御干旱胁迫,并且在所研究的光合酶中,仅有NADP-ME酶活性在不同程度的干旱胁迫下都显著升高,表明该基因在松叶猪毛菜响应干旱胁迫中具有重要作用。因此,本研究在上述体系中过表达松叶猪毛菜叶绿体型*NADP-ME*(*SaNADP-ME*1)的基础上,来初步验证瞬时转化体系的可行性。高效快速的松叶猪毛菜瞬时遗传转化体系,可实现在短时间内重要基因功能的原位验证,加速松叶猪毛菜特色特殊基因的筛选以及利用进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转化受体材料为松叶猪毛菜组培苗。松叶猪毛菜种子于2018年在新疆博乐采集,根据本试验室已有的松叶猪毛菜无菌体系获得无菌组培苗。植物表达载体pCAMBIA1301和pBI121为本试验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α感受态细胞(全式金,北京),根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105为试验室保存菌株。所用培养基为农杆菌培养基(液/固体LB培养基+Kan 100 mg·L^{-1}+Rif 50 mg·L^{-1})和植物组织培养培养基(MS、1/2MS基本培养基)。

1.2 方法

1.2.1 *根癌农杆菌的活化及侵染液制备* 将含有目的基因的质粒用冻融法转化农杆菌EHA105,进行菌液PCR鉴定阳性单克隆,经平板划线后,挑取单菌落在含抗生素(50 mg·L^{-1} Kan +50 mg·L^{-1} Rif)的LB液体培养基中培养,220 rpm,28 ℃,过夜扩大培养至菌液浓度OD_{600}为0.5~0.8。吸取少量菌液进行二次活化,待菌液生长至OD_{600}为0.5~0.8时,按1:100加入新鲜的LB培养基中进行培养,待农杆菌再次生长至OD_{600}为0.5~0.6,5000 rpm,10 min,离心弃去LB培养基,用3 mL的20 mM的$CaCl_2$悬浮菌体,5000 rmp,离心5 min,弃去上清液;菌体悬浮于转化液[(1/2MS+3%蔗糖+100 μmol·L^{-1}乙酰丁香酮(AS)+0.02% Tween20,pH=5.6)],调节OD_{600}为0.8,28 ℃静置活化1 h用于转化。

1.2.2 *松叶猪毛菜组培苗准备* 将松叶猪毛菜种子用无菌水:次氯酸钠=7:3消毒8 min后,再用无菌水反复冲洗7~8次,置于萌发培养基(1/2MS+15 g·L^{-1}蔗糖+8 g·L^{-1}琼脂)上,在人工气候箱中萌发(白天:25 ℃,14 h;夜晚:18 ℃,10 h,光照强度为12000 Lux)。萌发7 d后,将无菌幼苗移植在新的培养基(1/2MS+15 g·L^{-1}蔗糖+6 g·L^{-1}琼脂)中,人工气候箱其他条件不变,光照(30000 Lux)培养。设置3次重复,每次处理个数为30个。

1.2.3 *根癌农杆菌瞬时转化松叶猪毛菜* 选取苗龄30 d的大小较一致的松叶猪毛菜组培苗完全置于转化液中,室温下,120 rmp,侵染6 h。接着用无菌水反复冲洗成苗3~4次,滤纸吸干。再将植株转移到共培养培养基(1/2MS +100 转移到共·L^{-1} AS+1 g·L^{-1}琼脂粉)中进行黑暗共培养,2 d后用于*GUS*组织染色和取样。

1.2.4 *影响松叶猪毛菜瞬时转化效率的因素* 在使用农杆菌对松叶猪毛菜组培苗进行侵染时,影响因子包括:质粒表达载体、植株生长状态(苗龄)、农杆菌菌液浓度、侵染时间、AS浓度等[28-30]。在试验设计过程中,分别以某一因子为单一变量,其他因子以转化程序为标准,观察不同影响因子对松叶猪毛菜瞬时转化效率的影响。

(1) 植物表达载体的选择

建立瞬时转化体系时选择pCAMBIA1301和pBI121两种载体做对比,报告基因均为*gus*。基本培养条件同1.2.3。

(2) 苗龄的确定

基本培养条件同1.2.3,将苗龄期分别设置为7、30、60 d。

(3) 农杆菌侵染菌液浓度的确定

基本条件同1.2.3,农杆菌菌液浓度OD_{600}值分别设置为0.5、0.8、1.1。

(4) 农杆菌侵染时间的确定

基本条件同1.2.3,侵染时间分别设置为4、6、8 h。

(5) AS浓度的确定

基本条件同1.2.3,AS浓度分别设置0、100、200、300 μmol·L^{-1}。

1.2.5 转化植株的GUS组织染色鉴定 依据郭勇等[31]的GUS组织化学染色方法进行了改良。将共培养2 d后的松叶猪毛菜苗用无菌水彻底清洗并在滤纸上蘸干后,置于GUS染液中,于恒温箱中37 ℃保温、避光(用锡箔纸包裹50 mL离心管)过夜。染色后植株浸泡在无水乙醇:冰乙酸=3:1的脱色液中,期间更换2~3次,直到整个植株脱去叶绿素为止,对植株进行观察、统计染色情况并拍照。瞬时转化效率=(成功染色植株数/染色的植株总数)×色的植株。

1.2.6 *SaNADP-ME*1过表达载体的构建 运用In-fusion克隆技术,根据*SaNADP-ME*1序列和pCAMBIA1301载体序列设计并合成引物,以松叶猪毛菜cDNA为模板,进行PCR扩增,回收目的片段,连接至用*Nco* I和*Bgl* Ⅱ双酶切后的pCAMBIA1301载体上,连接产物转化DH5α,通过菌液PCR鉴定后,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。提取鉴定正确重组质粒DNA。

1.2.7 瞬时转化材料的分子鉴定

(1)转化植株中*gus*的PCR检测

由TransZol Up Plus RNA Kit(全式金,北京)试剂盒提取转化植株的总RNA,选取A_{260}/A_{280}在1.8~2.2范围内且A_{260}/A_{230}大于2.0的RNA样品用于反转录合成cDNA。用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)来合成cDNA。

以cDNA为模板,*β-actin*作为内参基因[14],*β-actin*和*gus*的PCR引物见表1。反应体系为20 μL:2× Tag PCR MasterMix 10 μL;上游引物1 μL;下游引物1 μL;cDNA反应液1 μL;ddH$_2$O 6 μL。PCR扩增条件为95 ℃预变性3 min;95 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,34个循环数;72 ℃延伸7 min。

(2)转化植株中*SaNADP-ME*1的荧光定量PCR检测

将cDNA稀释10倍后用作反应模板,*β-actin*作为内参基因[14],*β-actin*和*SaNADP-ME*1的荧光定量PCR引物见表1,使用TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)试剂盒,在CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)仪器上进行荧光定量PCR反应。反应条件为95 ℃预变性3 min;95 ℃变性5 s,55 ℃退火15 s,72 ℃延伸10 s,40个循环。每个样品设计3个技术重复,利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对定量分析,通过双因素方差分析进行方差分析,用GraphPad Prism.v 5.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 影响松叶猪毛菜瞬时转化效率的因素

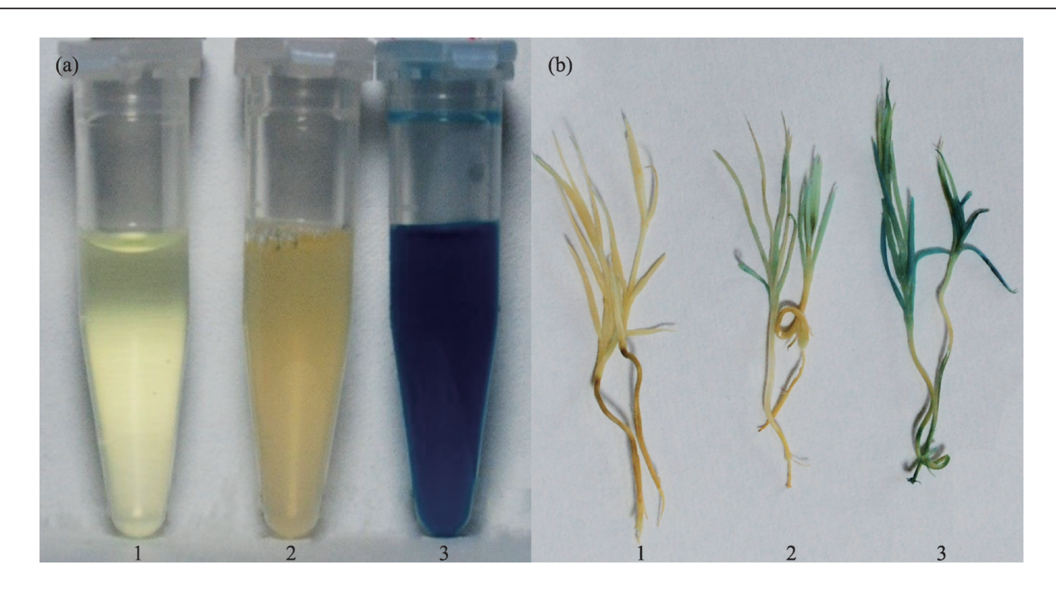
2.1.1 植物表达载体的选择 载体pBI121和pCAMBIA1301均携带报告基因*gus*,其中,pCAMBIA1301携带的*gus*上含有一段190 bp的内含子序列。以往有研究表明[32],在携带内含子的*gus*转化的植物中,内含子被有效剪接,可以产生GUS酶活性,而原核生物中缺乏真核剪接装置,在含有该构建体的农杆菌中不能检测到GUS酶活性,从而可有效排除农杆菌在细胞间质表达而造成的假阳性现象。因此,本试验将携带质粒pCAMBIA1301和pBI121的农杆菌EHA105,体外进行GUS染色(图1a),含有pBI121质粒的农杆菌菌液呈深蓝色,而含有pCAMBIA1301质粒的农杆菌菌液中无颜色变化,说明EHA105(pBI121)菌株内产生了GUS活性,EHA105(pCAMBIA1301)菌株则没有产生GUS活性。分别将EHA105(pBI121)和EHA105(pCAMBIA1301)菌液侵染整株植物,GUS染色结果(图1b)

表1 试验引物序列

Tab. 1 Primer sequences in this experiment

引物	引物序列(5'–3')
pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-F	ACGGGGGACTCTTGACCATGATCTC TCTTCAAAAAGCTAACT
pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-R	TACCCTCAGATCTACCATCCGGTAG CTTCTGTAAGCAGGG
β-actin-F	TCCACGAAACAACCTACAACTC
β-actin-R	CAGCAATACCGGGGAACAT
gus-F	TGTCGCGCAAGACTGTAACCAC
gus-R	ATCGGCGAAATTCCATACCTGT
*SaNADP-ME*1-F	AGCACAAAAGTTGGTGGGGA
*SaNADP-ME*1-R	TTCTCACGAGCCTGCTCAAG

注:下划线表示酶切位点。



注：a图中的1：阴性对照，2：农杆菌EHA105 (pCAMBIA1301)，3：农杆菌EHA105 (pBI121)。b图中的1：阴性对照，侵染农杆菌EHA105的植株；2：侵染农杆菌EHA105 (pCAMBIA1301)的植株；3：侵染农杆菌EHA105 (pBI121)的植株。

图1 农杆菌菌液和瞬时转化植物的GUS染色

Fig. 1 GUS staining of *Agrobacterium* and transient transformed plants

均显示肉眼可见的蓝色区域，表明pCAMBIA1301和pBI121载体都在植物体内成功表达外源基因*gus*。但是pCAMBIA1301载体因内含子序列的存在，*gus*表达只在真核生物中出现，从而可以有效排除*gus*在细胞间质表达的假阳性。因此，本试验在瞬时转化系统建立时选用EHA105(pCAMBIA1301)菌株来侵染植物材料。

2.1.2 苗龄对瞬时转化效率的影响 植物的生理状况对农杆菌侵染效果有很大的影响[28]。本试验分别对苗龄为7 d(子叶阶段)、30 d(真叶阶段)、60 d(成苗阶段)的松叶猪毛菜植株，用农杆菌EHA105(pCAMBIA1301)菌液进行转化，共培养后染色结果如图2所示，7 d和30 d的幼苗在叶片均显示蓝色，而部分60 d成苗只在叶尖较小区域显示微弱的蓝色，可能随着植株逐渐成熟老化，叶肉细胞密集，细胞表面角质较厚，不利于农杆菌的转化。7 d苗龄的松叶猪毛菜虽然叶肉细胞疏松，角质较薄，易于农杆菌的转化，但是其叶片还处于子叶阶段且材料较小。并且根据课题组前期研究发现，子叶的光合类型为C_3型，真叶的光合类型为C_3-C_4中间型[7]。因此，为了后期研究松叶猪毛菜的C_3-C_4光合类型特性，可选取30 d成苗的松叶猪毛菜作为转化材料。

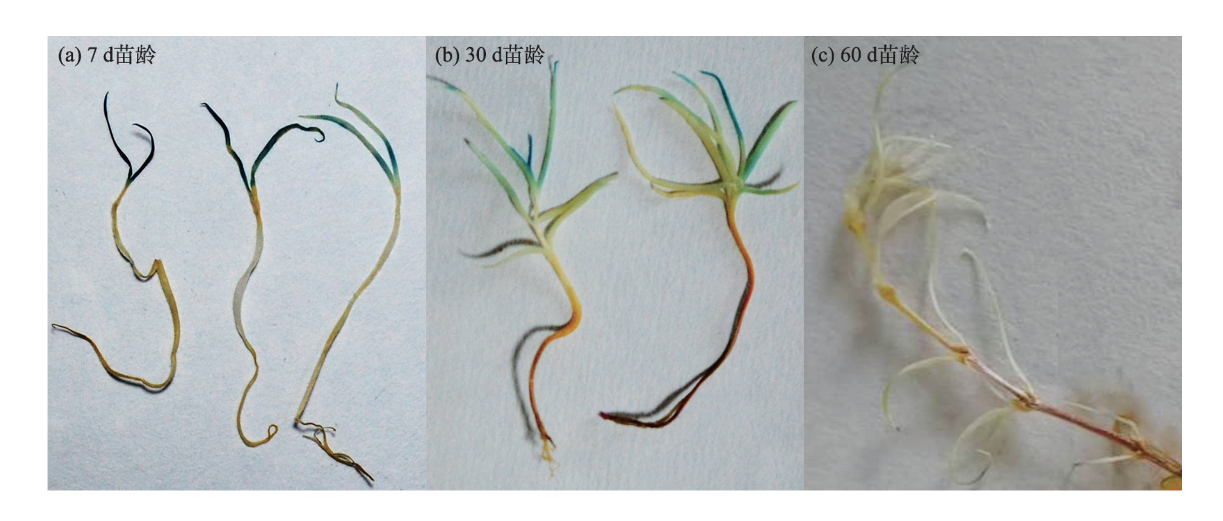


图2 不同苗龄植株的GUS染色

Fig. 2 GUS staining in plants of different seedling ages

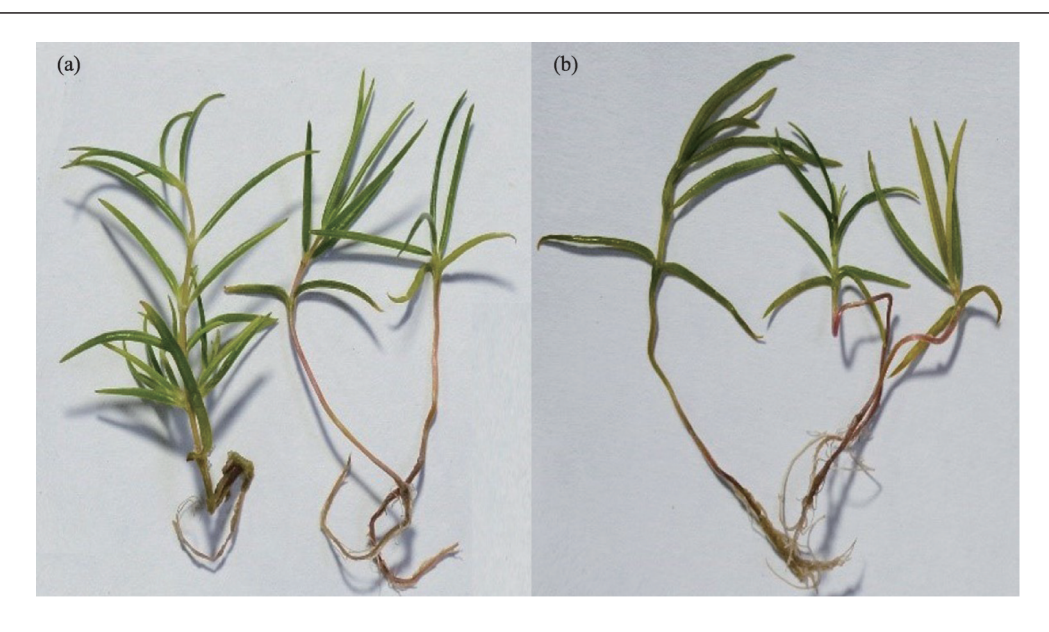
2.1.3 农杆菌侵染菌液浓度对瞬时转化的影响 农杆菌侵染菌液浓度是影响瞬时转化的一个重要的因素之一[29]。为了获得最适转化条件，分别选用了农杆菌菌液 OD_{600} 为0.5、0.8、1.1的转化液。染色结果如表2所示，侵染液 OD_{600} 为0.5时，转化效率为70%左右；随着侵染液浓度的升高，转化率呈现上升，当侵染液 OD_{600} 为0.8时，转化效率可达到91%左右；当侵染液 OD_{600} 达到1.1时，共培养2 d后，植株表面被菌体覆盖，部分植株出现软化、褐化且难以恢复的现象，转化效率降低至89%左右（图3b）。因此，在本试验中，农杆菌菌液 OD_{600} 为0.8时，瞬时转化效率最高。

2.1.4 农杆菌侵染时间对瞬时转化的影响 除了菌液的浓度，侵染时间对瞬时转化的效率也起着至关重要的作用[28]，侵染时间过短，不利于农杆菌附着于植物表面，难以获得阳性转化植株，侵染时间过长，农杆菌污染严重，会导致植物萎蔫、玻璃化，难以恢复正常状态。本研究分别设置侵染时间为4、6、8 h。结果显示（表2），侵染时间为4 h时，转化效率为78%左右；侵染时间为6 h时，转化效率为90%左右；侵染时间为8 h时，转化效率达到了99%左右。随着侵染时间的增加，转化效率得到了提高，但是侵染时间达到8 h的植物在染色前出现了萎蔫、玻璃化，共培养难以恢复，不利于瞬时转化后的

表2 不同因素下阳性植株的瞬时转化效率

Tab. 2 Transient conversion efficiency of positive plants under different factors

瞬时转化条件		组培苗总数/个	成功染色的植株数/个	转化率/%	平均转化率/%
农杆菌菌液浓度/OD_{600}	0.5	30	21	70	70
		30	20	67	
		30	22	73	
	0.8	30	27	90	91
		30	27	90	
		30	28	93	
	1.1	30	26	87	89
		30	27	90	
		30	27	90	
侵染时间/h	4	30	23	77	78
		30	24	80	
		30	23	77	
	6	30	27	90	90
		30	27	90	
		30	27	90	
	8	30	29	97	99
		30	30	100	
		30	30	100	
AS浓度/(μmol·L^{-1})	0	30	11	37	40
		30	12	40	
		30	13	43	
	100	30	28	93	90
		30	27	90	
		30	26	87	
	200	30	28	93	92
		30	28	93	
		30	27	90	
	300	30	21	70	70
		30	21	70	
		30	21	70	



注:(a)侵染6 h、侵染液浓度OD_{600}为0.8;(b)侵染6 h、侵染液浓度OD_{600}为1.1。

图3 不同瞬时转化条件下共培养后的植物生理状态

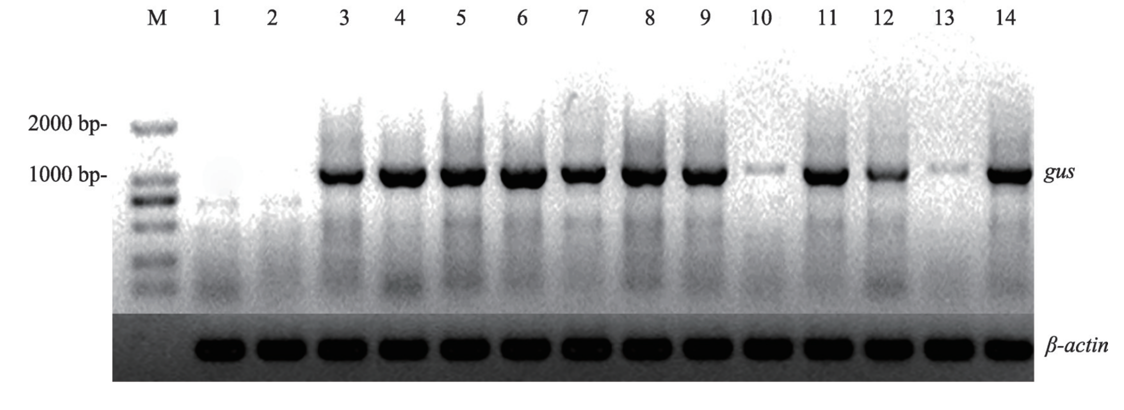
Fig. 3 Plant physiological state after co-culture under different transformation conditions

其他试验(与图3情况类似)。因此,侵染时间为6 h,瞬时转化效率可达最佳。

2.1.5 侵染液中AS浓度对瞬时转化的影响 在侵染液中加入合适浓度的AS,会促进农杆菌对植物的转化[30]。本研究分别在侵染液中添加浓度为0、100、200、300 μmol·L^{-1}的AS。GUS染色结果表明,在侵染液中添加一定浓度的AS,可以有效提高农杆菌对松叶猪毛菜成苗的转化效率,随着AS浓度的增加,转化效率也增加,在AS浓度为200 μmol·L^{-1}时,转化效率达到了92%左右,*gus*表达效果和覆盖效果达到了最高,但随着AS浓度的再次增高,转化效率反而降低,在AS浓度达到300 μmol·L^{-1}时,转化率下降到了70%左右(表2)。因此,瞬时转化的最佳AS浓度为200 μmol·L^{-1}。

2.2 松叶猪毛菜瞬时转化植株的*gus*转录水平检测

将不同条件下瞬时转化的植株共培养2 d后,取样提取RNA进行PCR检测(图4),在内参基因*β-actin*表达一致的情况下,随机选择的不同条件转化植株cDNA在*gus*的特异性引物扩增下都有表达,且表达量有所不同,而阴性对照没有表达,充分说明该*gus*成功的瞬时转化到松叶猪毛菜植株中,并在转录水平上得到了表达。



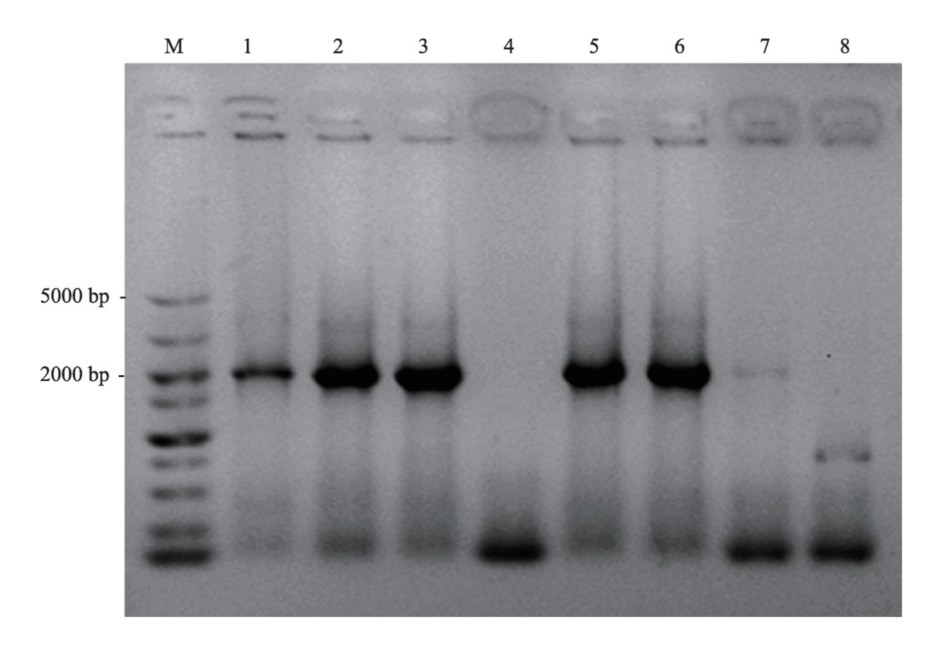
注:M:DL2000 DNA Maker;1-2:阴性对照,侵染农杆菌EHA105的植株;3-14:侵染农杆菌EHA105 (pCAMBIA1301)的植株。

图4 RT-PCR检测瞬时转化材料中*gus*的表达

Fig. 4 The detection of *gus* expression in transient transformants by RT-PCR

2.3 过表达*SaNADP-ME*1

2.3.1 *SaNADP-ME*1过表达载体的构建　以松叶猪毛菜cDNA为模板，利用引物pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-F/R进行PCR扩增，电泳检测PCR产物，显示在1 900 bp左右有单一带。使用*Nco* I和*Bgl* Ⅱ双酶切pCAMBIA1301质粒载体，将线性化载体和目的片段回收连接，转化大肠杆菌，挑取单克隆进行菌液PCR鉴定（图5），阳性菌液进行测序，将测序正确的目的克隆命名为pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-*gus*。



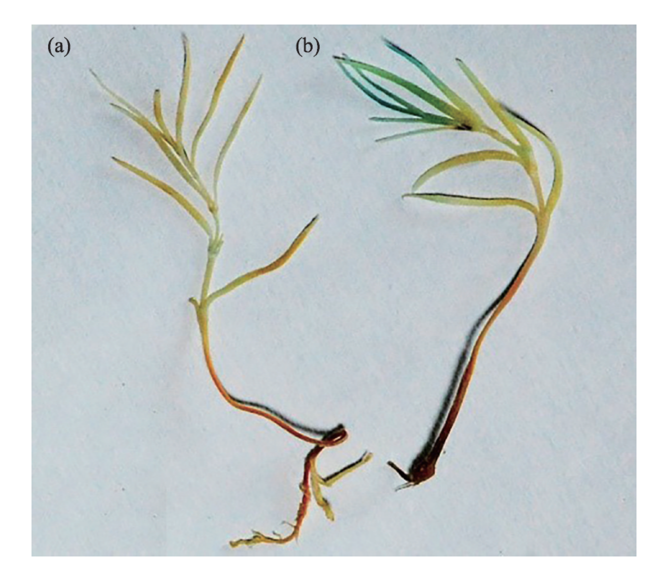
注：M为DL5000 DNA Maker；1~6为重组子；7为阳性对照，cDNA；8为阴性对照，农杆菌EHA105。

图5　重组子菌液PCR鉴定

Fig. 5　Colony PCR digestion of the restructuring the vector

2.3.2 *SaNADP-ME*1过表达植株的获取及表达量检测　基础实验表明，采用30 d苗龄植株，农杆菌侵染浓度OD_{600}为0.8，在侵染液中添加200 μmol·L^{-1}AS，侵染6 h，瞬时转化效率最佳。将重组载体pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-*gus*按上述体系瞬时转化松叶猪毛菜后，进行GUS染色。与对照相比，阳性转化植株呈现蓝色（图6），说明转化植株具有GUS活性，*SaNADP-ME*1成功转至松叶猪毛菜中。

荧光定量分析表明，相比于阴性对照，EHA105（pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-*gus*）瞬时转化阳性植株中的表达量显著增高，且阳性植株与阴性植株中*SaNADP-ME*1的相对表达量相差约10倍（图7），说明*SaNADP-ME*1成功在松叶猪毛菜中过表达，瞬时转化的松叶猪毛菜植株可以作为后续探究*SaNADP-ME*1功能的材料。



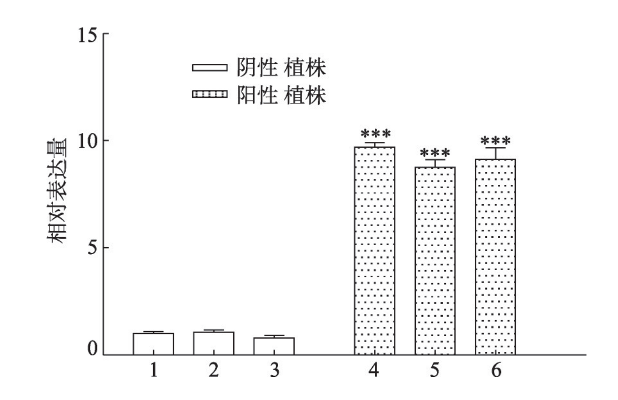
注：（a）阴性对照，侵染农杆菌EHA105的植株；（b）侵染农杆菌EHA105(pCAMBIA1301-*SaNADP-ME*1-*gus*)的植株。

图6　瞬时过表达*SaNADP-ME*1植株的GUS染色

Fig. 6　GUS assay of plants with transient overexpression of *SaNADP-ME*1

3　讨　论

瞬时转化过程中，很多因素都会影响转化效率，因此，建立并逐步优化农杆菌介导的瞬时遗传



注：***表示在0.01水平有极显著差异，数值为平均值±标准差。

图7 瞬时过表达植株中*SaNADP-ME*1的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of *SaNADP-ME*1 in transient overexpressing plants

转化体系是必要的。农杆菌作为瞬时转化的媒介，侵染的菌液浓度直接影响瞬时转化效率，浓度过高或过低都不利于转化[29-30]。过高浓度的菌液，对植物有一定毒害作用，使得植物软化、萎蔫，从而使外源基因的瞬时表达量下降。但菌液浓度过低，也会因农杆菌数目不足影响转化率。本试验结果显示，农杆菌菌液 OD_{600} 值为0.8时，转化率较高，达到91%。这与李心悦等[33]得出的最适宜转化的农杆菌浓度为0.6结果相近。

侵染时间也是影响瞬时转化效率的关键性因素[33]。适宜的侵染时间十分重要，本研究发现，如果农杆菌侵染时间过长，则植株表面会有大量的农杆菌残留，在后期的培养过程中，残留农杆菌可能会大量增殖，且难以控制，导致植株死亡；侵染时间过短，菌液与植株接触不够充分，会降低转化效率，导致大量非抗性苗出现。因此,确定利用农杆菌侵染30 d苗龄的松叶猪毛菜植株，侵染6 h较为合适。

此外，在侵染液中添加合适浓度的AS，在一定程度上也可以促进外源基因整合到植物体内，从而提高瞬时转化效率[34-35]。例如，Kim等[36]利用农杆菌对辣椒进行遗传转化的过程中添加AS，可以明显提高辣椒遗传转化效率，将其提高至95%以上。但是，AS浓度过高不仅不利于农杆菌的转化，反而会对植物造成毒害，或者过高浓度的AS将过度诱导农杆菌*Vir*的表达，增强了农杆菌侵染活力，使转化的植株受到农杆菌的毒害，从而不利于植物的恢复，影响遗传转化效果[37]。本试验的探索结果显示，侵染液中未添加AS时，瞬时遗传转化效率只有40%，而添加了AS后，转化效率均提高至70%以上。其中，添加的AS浓度为200 μmol·L^{-1}时，转化效率最高，达92%。这与杨国顺等[38]认为的最适AS浓度一致。

利用上述获得的瞬时转化体系，本试验在松叶猪毛菜植株中过表达*SaNADP-ME*1，进行GUS染色和实时荧光定量PCR，结果都显示：*SaNADP-ME*1成功在转化植株中过表达，说明该瞬时转化体系适用于外源基因在松叶猪毛菜中快速表达。松叶猪毛菜瞬时遗传转化系统及构建的植物过表达载体为基因功能的原位初步验证提供可靠的手段，也为深入探究 C_3-C_4 中间型植物松叶猪毛菜NADP-ME的功能奠定了基础。

参考文献（References）：

[1] 武维华. 植物生理学[M]. 第2版 北京: 科学出版社, 2008: 163−190. [Wu Weihua. Plant Physiology[M]. 2 Ed. Beijing: Science Press, 2008: 163−190.]

[2] Christin P A, Sage T L, Edwards E J, et al. Complex evolutionary transitions and the significance of C_3-C_4 intermediate forms of photosynthesis in Molluginaceae [J]. Evolution, 2011, 65(3): 643−660.

[3] Sage R F. The evolution of C_4 photosynthesis [J]. New Phytologist, 2004, 161(10): 341−370.

[4] Kennedy R A, Laetsch W M. Plant species intermediate for C_3, C_4 photosynthesis[J]. Science, 1974, 184(4141): 1087−1089.

[5] Sage R F, Khoshravesh R, Sage T L. From proto-Kranz to C_4 Kranz: Building the bridge to C_4 photosynthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(13): 3341−3356.

[6] 龚春梅, 宁蓬勃, 王根轩, 等. C_3和C_4植物光合途径的适应性变化和进化[J]. 植物生态学报, 2009, 33(1): 206−221. [Gong Chunmei, Ning Pengbo, Wang Genxuan, et al. A review of adaptable variations and evolution of photosynthetic carbon assimilating pathway in C_3 and C_4 plants [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2009, 33(1): 206−221.]

[7] Wen Z B, Zhang M L. Anatomical types of leaves and assimilating shoots and carbon $^{13}C/^{12}C$ isotope fractionation in Chinese representatives of Salsoleae s.l. (Chenopodiaceae) [J]. Flora, 2011, 206 (8): 720−730.

[8] 闻志彬, 冯缨. 新疆猪毛菜属植物多样性及其地理分布特征[J]. 干旱区研究, 2020, 37(1): 185−192. [Wen Zhibin, Feng Ying. Biodiversity and geographical distribution of the genus *Salsola* L. in Xinjiang [J]. Arid Zone Research, 2020, 37(1): 185−192.]

[9] Wen Z B, Zhang M L. *Salsola laricifolia*, another C_3-C_4 intermediate species in tribe Salsoleae s.l. (Chenopodiaceae) [J]. Photosynthesis Research, 2015, 123(1): 33−43.

[10] Wen Z B, Zhang M L, Meng H H. *Salsola arbusculiformis* and *S. laricifolia* (Chenopodiaceae) in China [J]. Nordic Journal of Botany, 2014, 32(2): 167−175.

[11] Schssler C, Freitag H, Koteyava N, et al. Molecular phylogeny and

forms of photosynthesis in tribe *Salsoleae* (Chenopodiaceae) [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(2): 207–223.

[12] Voznesenskaya E V, Koteyeva N K, Akhani H, et al. Structural and physiological analyses in *Salsoleae* (Chenopodiaceae) indicate multiple transitions among C_3, intermediate, and C_4 photosynthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(12): 3583–3604.

[13] Freitag H, Kadereit G. C_3 and C_4 leaf anatomy types in Camphorosmeae (Camphorosmoideae, Chenopodiaceae) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2014, 300(4): 665–687.

[14] 闻志彬, 张明理. 松叶猪毛菜干旱胁迫下实时定量PCR内参基因的筛选[J]. 植物生理学报, 2015, 51(11): 2031–2038. [Wen Zhibin, Zhang Mingli. Reference gene selection for real-time quantitative PCR in *Salsola laricifolia* under soil drought stress [J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(11): 2031–2038.]

[15] 周文菲. 猪毛菜属植物不同光合型的比较进化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018. [Zhou Wenfei. A Comparative Study on the Evolution of Different Photosynthetic Types in Salsola Genus [D]. Yangling: Northwest A & F university, 2018.]

[16] 赵文婷, 魏建和, 刘晓东, 等. 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展[J]. 生物技术通讯, 2013(2): 294–300. [Zhao Wenting, Wei Jianhe, Liu Xiaodong, et al. Advance of the main methods and applications of plant transient expression system [J]. Biotechnology Bulletin, 2013(2): 294–300.]

[17] Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3 (2): 259–273.

[18] Li J F, Park E, Arnima G V, et al. The FAST technique: A simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species [J]. Plant Methods, 2009, 5(1): 6.

[19] Grefen C, Donald N, Hashimoto K, et al. A ubiquitin–10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies [J]. The Plant Journal, 2010, 64(2): 11.

[20] Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, et al. *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: Application to the Rx2 locus in potato [J]. The Plant Journal, 2000, 21(1): 73–81.

[21] Wydro M, Kozubek E, Lehmann P. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*[J]. Acta Biochimica Polonica, 2006, 53(2): 289–298.

[22] 王碧莹, 谷金芸, 霍春红, 等. 根瘤农杆菌介导的喜树叶片瞬时转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5624–5630. [Wang Biying, Gu Jinyun, Huo Chunhong, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient transforation system in *Camtotheca acuminate* leaves[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(17): 5624–5630.]

[23] 孟妮, 刘雅莉, 窦雪溪, 等. 蝴蝶兰花瓣瞬时转化体系建立[J]. 西北植物学报, 2018, 38(6): 1017–1023. [Meng Ni, Liu Yali, Dou Xuexi, et al. Transient gene expression in *Phalanopsis aphrodite* petals via *Agrobacterium tumefaciens* infiltration [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(6): 1017–1023.]

[24] 杜鹃, 赵峰, 曹越平. 超声波辅助农杆菌介导转化大豆*GUS*基因在不同外植体中的瞬时表达[J].上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(5): 439–441. [Du Juan, Zhao Feng, Cao Yueping. Effects of sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT) on transient expression of *GUS* in explants soybean [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science Edition), 2010, 28(5): 439–441.]

[25] Zheng L, Liu G, Meng X, et al. A versatile *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for herbaceous plants and trees [J]. Biochemical Genetics, 2012, 50(10): 761–769.

[26] 邹全程, 唐绯绯, 刘中原, 等. 瞬时过表达*ThCBL4*基因提高刚毛柽柳耐盐能力[J]. 林业科学研究, 2018, 31(3): 63–70. [Zou Quancheng, Tang Feifei, Liu Zhongyuan, et al. A novel calcineurin B-like proteins gene (*ThCBL4*) improving the salt tolerance in transient overexpression *Tamarix hispida*[J]. Forest Research, 2018, 31(3): 63–70.]

[27] Maier A, Zell M B, Maurino V G. Malate decarboxylases: Evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C_4 and C_3 photosynthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(9): 3061–3069.

[28] Bhaskar P B, Muthusubramanian V, Lei W, et al. *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: A rapid tool for functional gene assay in potato [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5812.

[29] 吴英杰, 姜波, 张岩, 等. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化[J]. 东北林业大学学报, 2016, 38(9): 110–112. [Wu Yingjie, Jiang Bo, Zhang Yan, et al. Transient expression in tobacco by *Agrobacterum* mediated transformation[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 38(9): 110–112.]

[30] Kayani W K, Fattahi M, Palazn J, et al. Comprehensive screening of influential factors in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the Himalayan elixir: *Ajuga bracteosa* Wall. ex. Benth [J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2016, 3(4): 151–159.

[31] 郭勇, 王玉成, 王智博. 一种基于农杆菌介导的拟南芥瞬时转化技术优化[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(6): 41–44,83. [Guo Yong, Wang Yucheng, Wang Zhibo. Optimizing transient genetic transformation method on *Arabidopsis* plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 44(6): 41–44,83.]

[32] 王蕾. 棉花子叶瞬时表达系统的建立及应用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2014. [Wang Lei. Establishment and Application of Transient Transforation System in Cotyledon of Cotton [D]. Xi'an: Shanxi Normal University, 2014.]

[33] 李心悦, 张克闯, 张道远, 等. 新疆野苹果瞬时遗传转化方法建立及初步验证[J]. 分子植物育种, 2018, 16(22): 7315–7321. [Li Xinyue, Zhang Kechuang, Zhang Daoyuan, et al. A stablish *Malus sieversii* transient genetic transformation methods and preliminary

validation[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(22): 7315−7321.]

[34] 徐坤. 大豆瞬时转化体系和遗传转化体系的建立与应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014. [Xu Kun. The Construction and Application of Soybean Transient and Genetic Transformation [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.]

[35] 卓露, 张道远, 李小双, 等. 荒漠苔藓齿肋赤藓(*Syntrichia caninervis* Mitt.)瞬时遗传转化方法建立[J]. 分子植物育种, 2018, 17(6): 1913−1919. [Zhuo Lu, Zhang Daoyuan, Li Xiaoshuang, et al. Establishment of transient genetic transformation method for desert moss *Syntrichia caninervis* mitt. [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 17(6): 1913−1919.]

[36] Kim S, Kim S R, An C S, et al. Constitutive expression of rice MADS box gene using seed explants in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Molecules & Cells, 2001, 12(2): 221.

[37] 陆姗姗. 苦豆子瞬时转化体系的建立和*SaLDC*启动子功能分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2017. [Lu Shanshan. A Stablishment of Transient Transformation System of *Sophora alopecuroides* L. and Foundation Analysis of SaLDC Promoter [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2017.]

[38] 杨国顺, 谢丙炎, 杨宇红, 等. 应用绿色荧光蛋白报告基因优化辣椒的遗传转化体系[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 737−742. [Yang Guoshun, Xie Bingyan, Yang Yuhong, et al. Improvement of genetic transformation system by using GFP as reporter gene on pepper [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31(6): 737−742.]

The establishment and preliminary verification of the transient transformation system of *Salsola laricifolia*

XIA Chun-lan[1,2], LI Ya-nan[3], WEN Zhi-bin[1]

(1. *Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land of Chinese Academy of Sciences, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi* 830011, *Xinjiang, China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China;* 3. *College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi* 832003, *Xinjiang, China*)

Abstract: *Salsola laricifolia* is an intermediate type of C_3-C_4 of the genus Chenopodiaceae, which is an ideal material for studying the evolution of the C_4 pathway and the mechanism of photorespiration reduction. In this study, sterile seedlings of *S. laricifolia* were used as experimental materials to investigate the transient expression mediated by *Agrobacterium*. Effects of the plasmid vector, seedling age, *Agrobacterium* (containing pCAMBIA1301 plasmid) concentration, infection time, and acetosyringone (AS) concentration were analyzed to determine the optimal transformation condition. Under these optimal conditions, the chloroplast-type NADP-malic enzyme gene (*SaNADP-ME*1) was over expressed in the *S. laricifolia*, as detected by the GUS histochemical staining and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). (1) pCAMBIA1301-*gus* was used to construct the expression vector, and the 30-day-old seedling was used as the transformation receptor. By adding 200 μmol · L^{-1} of AS to the immersion solution, the OD_{600} of *Agrobacterium* was 0.8, and by transforming for 6 h, the transient transformation efficiency was the best (92%). (2) The overexpression vector was constructed and transiently transformed into the *S. laricifolia* plant. GUS activity was detected by staining, and the quantitative expression of *SaNADP-ME*1 detected by real-time PCR was significantly higher than that of the control group, indicating that the gene was successfully transiently overexpressed into the plant. In summary, this experiment established a rapid gene function verification method in *S. laricifolia*, which laid a foundation for studying the gene function of *S. laricifolia*.

Keywords: *Salsola laricifolia*; transient transformation; *Agrobacterium*; GUS histochemical staining; *SaNADP−ME*1